

MEDICAL SOLUTION FREE FROM SERUM PRESCRIBED FOR OPHTHALMOLOGICAL USE AND TREATMENT USING THE SAME

Publication number: JP2000198701 (A)

Publication date: 2000-07-18

Inventor(s): DEBRA L SKELNICK +

Applicant(s): BAUSCH & LOMB SURGICAL INC +

Classification:

- **international:** **A01N1/02; A61K9/08; C12N5/06; A01N1/02; A61K9/08; C12N5/06; (IPC1-7): A01N1/02; A61K9/08**

- **European:** **A01N1/02; A01N1/02C2P; C12N5/06B8C**

Application number: JP19990313063 19991102

Priority number(s): US19980186580 19981105

Also published as:

EP1000541 (A1)

EP1000541 (B1)

US6153582 (A)

PT1000541 (E)

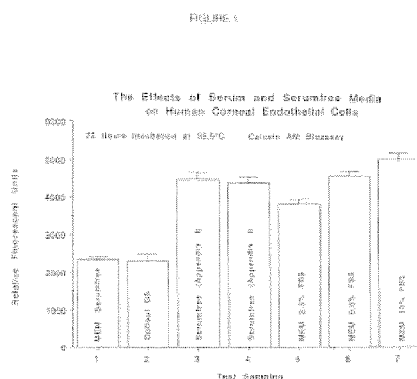
ES2217700 (T3)

[more >>](#)

Abstract of JP 2000198701 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a prescribed medium free from serum used in the technique for cultivating organs at 31-38 deg.C and to particularly provide a material and a method for improving the quality of ophthalmic tissues (particularly corneal tissues) in the storage before transplantation.

SOLUTION: The medical solution free from serum prescribed for ophthalmological use is obtained by including one or more kinds of nutrient supplementary agents for cells and growth factors which not only store ophthalmic tissues containing human corneal tissues, retinal tissues and ectocorneal tissues at a low temperature to physiological temperature (2-38 deg.C) but also improve their qualities. The solution is comprised of a glucosaminoglycan, a deturgescence agent, an energy source, a buffer, an antioxidant, a membrane-stabilizing agent, an antibiotic and/or an antifungal agent, an ATP or energy precursor, a nutrient supplementary agent for cells, a coenzyme or an enzyme supplementary agent, a nucleotide precursor, a hormone supplementary agent, a nonessential amino acid, a rare mineral or a minor element, a nutrient containing a growth factor and an aqueous solution containing a prescribed electrolyte.



Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-198701

(P2000-198701A)

(43)公開日 平成12年7月18日(2000.7.18)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テーマコード* (参考)

A 0 1 N 1/02

A 0 1 N 1/02

A 6 1 K 9/08

A 6 1 K 9/08

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 19 頁)

(21)出願番号 特願平11-313063

(22)出願日 平成11年11月2日(1999.11.2)

(31)優先権主張番号 09/186580

(32)優先日 平成10年11月5日(1998.11.5)

(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 599155143

ボシュ ロム サージカル インコーポレ
イテッドBAUSCH & LOMB SURGI
CAL, INC.アメリカ合衆国、ミズーリ州、セントルイ
ス、ツリー コート インダストリアル
ブルバード 3365

(72)発明者 デブラ エル. スケルニック

アメリカ合衆国、ミネソタ州 55008、ケ
ンブリッジ 6150 カウンティ ロード
5

(74)代理人 100077665

弁理士 千葉 剛宏 (外1名)

(54)【発明の名称】 眼科用の規定された無血清医療溶液およびそれを用いた処置方法

(57)【要約】

【課題】 31℃～38℃にて器官培養技術に使用する規定された無血清媒体を提供することにより、特に、移植前の保存に際し眼組織（特に角膜組織）の品質を向上させる材料および方法を提供することにある。

【解決手段】 低温度～生理学温度（2℃～38℃）にてヒト角膜組織、網膜組織および角膜上皮組織を含む眼組織を保存すると共に品質を向上させる1種もしくはそれ以上の細胞栄養補充剤および成長因子を含有する、眼科で使用するための規定された無血清医療溶液を使用する。この溶液はグリコサミノグルカン、デツルゲッセン
ト剤、エネルギー源、緩衝系、酸化防止剤、膜安定化剤、抗生物質および／または抗カビ剤、ATPもしくはエネルギー前駆体、栄養細胞補充剤、補酵素および酵素補充剤、ヌクレオチド前駆体、ホルモン補充剤、非必須アミノ酸、微量無機質および微量元素、および成長因子が補充された栄養分および電解質の規定された水溶液で構成される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】下記a～pの成分の有効量を含むことを特徴とする無血清医療溶液。

- a. 栄養分および電解質の水溶液
- b. グリコサミノグリカン
- c. デツルゲッセント剤
- d. エネルギー源
- e. 緩衝系
- f. 酸化防止剤
- g. 膜安定化剤
- h. 抗生物質もしくは抗カビ剤
- i. ATPもしくはエネルギー前駆体
- j. 栄養細胞補充剤
- k. 補酵素および酵素補充剤
- l. スクレオチド前駆体
- m. ホルモン補充剤
- n. 非必須アミノ酸
- o. 微量無機質および微量元素
- p. 成長因子（動物、動物組換え体、ヒト組換え体もしくは天然）

【請求項2】低温度～生理学的温度（2℃～38℃）にて眼組織の保存を維持し、品質を向上させる成分を含有すると共に生理学的pHを有し、下記a～pの成分の有効量を含むことを特徴とする無血清医療溶液。

- a. 栄養分および電解質の水溶液
- b. グリコサミノグリカン
- c. デツルゲッセント剤
- d. エネルギー源
- e. 緩衝系
- f. 酸化防止剤
- g. 膜安定化剤
- h. 抗生物質もしくは抗カビ剤
- i. ATPもしくはエネルギー前駆体
- j. 栄養細胞補充剤
- k. 補酵素および酵素補充剤
- l. スクレオチド前駆体
- m. ホルモン補充剤
- n. 非必須アミノ酸
- o. 微量無機質および微量元素
- p. 成長因子（動物、動物組換え体、ヒト組換え体もしくは天然）

【請求項3】低温度～生理学的温度（16℃～38℃）にて眼組織の保存を維持し、品質を向上させる成分を含有すると共に生理学的pHを有し、下記a～pの成分の有効量を含むことを特徴とする無血清医療溶液。

- a. 栄養分および電解質の水溶液
- b. グリコサミノグリカン
- c. デツルゲッセント剤
- d. エネルギー源
- e. 緩衝系

- f. 酸化防止剤
- g. 膜安定化剤
- h. 抗生物質もしくは抗カビ剤
- i. ATPもしくはエネルギー前駆体
- j. 栄養細胞補充剤
- k. 補酵素および酵素補充剤
- l. スクレオチド前駆体
- m. ホルモン補充剤
- n. 非必須アミノ酸
- 10 o. 微量無機質および微量元素
- p. 成長因子（動物、動物組換え体、ヒト組換え体もしくは天然）

【請求項4】下記a～pの成分の有効量を含むことを特徴とする無血清医療溶液。

- a.
 - 1. ミニマル・エッセンシャル・メジウム（MEM）
 - 2. TC199メジウム
 - 3. ミニマル・エッセンシャル・メジウム（MEM）とTC199メジウムとの組合せ物

20 の群から選択される栄養分および電解質の水溶液

- b.
 - 1. 硫酸コンドロイチン
 - 2. 硫酸デルマチン
 - 3. 硫酸ヘパリン
 - 4. 硫酸ヘパラン
 - 5. 硫酸ケラタン
 - 6. ヒアルウロン酸

の群から選択される0.001mg/ml～1.0g/mlの範囲のグリコサミノグリカン

- 30 c.
 - 1. デキストラン
 - 2. 硫酸デキストラン
 - 3. ヒドロキシプロピルメチルセルロース
 - 4. カルボキシメチルセルロース
 - 5. 細胞ガム
 - 6. アルギン酸ナトリウム
 - 7. アルブミン
 - 8. ヒドロキシエチル澱粉
 - 9. ヒドロキシエチルセルロース
 - 10. デキストロース
 - 11. グルコース
 - 12. シクロデキストリン

の群から選択される0.001mg/ml～1.0g/mlの範囲のデツルゲッセント剤

- d.
 - 1. グルコース
 - 2. ピルビン酸塩
 - 3. 蔗糖
 - 4. フラクトース
 - 50 5. デキストロース

の群から選択される0.01mM~10mMの範囲のエネルギー源

e.

1. 重炭酸ナトリウム
2. 酢酸ナトリウム
3. クエン酸ナトリウム
4. 磷酸ナトリウム
5. HEPES緩衝剤

の群から選択される0.01mM~10mMの範囲の緩衝系

f.

1. L-アスコルビン酸
2. 2-メルカプトエタノール
3. グルタチオン
4. α -トコフェロール
5. α -トコフェロールアセテート
6. α -トコフェロールホスフェート
7. セレニウム

の群から選択される0.001 μ M~10mMの範囲の酸化防止剤

g.

1. ビタミンA
2. ビタミンB
3. レチノイン酸
4. トランスレチノイン酸
5. 酢酸レチノール
6. エタノールアミン
7. ホスフォエタノールアミン
8. トランスフェリン
9. レシチン
10. B-シトステロール
11. L- α -ホスファチジルコリン

の群から選択される0.001pg/ml~500mg/mlの範囲の膜安定化成分

h.

1. ゲンタマイシン
2. カナマイシン
3. ネオマイシン
4. バンコマイシン
5. オブラマイシン
6. クリンダマイシン
7. ストレプトマイシン
8. レボフロキサシン
9. ペニシリン
10. シクロスポリン
11. アンホテリシンB
12. ニスタチン

の群から選択される0.001 μ g/ml~100mg/mlの範囲の抗生物質および/または抗カビ剤

i.

1. アデノシン
2. イノシン
3. アデニン
4. フラビンアデニンジヌクレオチド
5. ウリジン5'-トリホスフェートNa
6. 5'-メチルシトシン
7. B-NAD (B-ニコチン酸アシドアデニンジヌクレオチド)
8. B-NADP Na (B-ニコチン酸アシドアデニンジヌクレオチドリナトリウム)

10 の群から選択される0.001mM~10mMの範囲のATPもしくはエネルギー前駆体

j.

1. アリニル-グルタミン
2. グリシル-グルタミン
3. L-アミノ-n-酪酸
4. L-アルギニン
5. D-ビオチン
6. ベタインHCl
7. D-カルニチン
8. カルシフェロール
9. カロチン
10. コレステロール
11. L-シスチン
12. L-システイン
13. L-グルタミン酸
14. D-グルコサミン
15. グルクロネート
16. D-グルクロノラクトン
17. L-ヒドロキシプロリン
18. ヒポキサンチン
19. L-イノシトール
20. グリシン

30

21. L-オルニチン
22. L-プロリン
23. L-セリン
24. ミオイノシトール
25. メナジオン
26. ナイアシン
27. ニコチン酸
28. p-アミノ安息香酸
29. D-パントテン酸
30. ビリドキサール-5-ホスフェート
31. ビリドキシンHCl
32. タウリン
33. チミジン
34. キサンチン
35. ビタミンB12

50 の群から選択される0.001 μ M~10mMの範囲の栄養細胞補充剤

k.

1. アセチル補酵素A
2. コカルボキシラーゼ
3. 補酵素A
4. 補酵素Q10
5. 補酵素K

の群から選択される0.001 μ M~10mMの範囲の補酵素および酵素補充剤

l.

1. 2'-デオキシアデノシン
2. 2'-デオキシシチジンHCL
3. 2'-デオキシグアノシン
4. 2-デオキシ-D-リボース
5. D-リボース

の群から選択される0.001 μ M~10mMの範囲のヌクレオチド前駆体

m.

1. B-エストラジオール
2. プロゲステロン
3. テストステロン
4. コルチソール
5. コルチコステロン
6. チロキシシン
7. 甲状腺刺激ホルモン
8. カルシトニン

の群から選択される0.001pg/ml~0.100mg/mlの範囲のホルモン補充剤

n.

1. L-アラニン
2. L-アスパラギン
3. L-アスパラギン酸
4. L-グルタミン酸
5. グリシン
6. L-プロリン
7. L-セリン

の群から選択される0.001 μ g/ml~100mg/mlの範囲の非必須アミノ酸

o.

1. CuSO₄·5H₂O
2. ZnSO₄·7H₂O
3. セレナイトNa
4. クエン酸第二鉄
5. MnSO₄·H₂O
6. NaSiO₃·9H₂O
7. モリブデン酸
8. NH₄VO₃
9. NiSO₄·6H₂O
10. SnCl₂
11. AgNO₃
12. Ba(C₂H₃O₂)₂

13. KBr

14. CdCl₂15. CoCl₂16. CrCl₃

17. NaF

18. GeO₂

19. KL

20. RbCl

21. ZrOCl₂·8H₂O

10 の群から選択される0.001pg/ml~0.100mg/mlの範囲の微量無機質および微量要素

p.

1. PDGF-BB

2. PDGF-AA

3. 神経成長因子

4. 神経成長因子B

5. 幹細胞因子

6. 形質転換成長因子-a

7. 形質転換成長因子-B

20 8. 血管内皮成長因子

9. B-内皮細胞成長因子

10. 表皮成長因子

11. 上皮ニュートロフィル活性化ペプチド

12. ヘパリン結合EGF様成長因子

13. 繊維芽細胞成長因子-酸性

14. 繊維芽細胞成長因子-塩基性

15. IGF-I

16. IGF-II

17. ケラチノサイト成長因子

30 18. 血小板由来内皮細胞成長因子

19. インシュリン

20. 肝細胞成長因子

の群から選択される0.001pg/ml~0.100mg/mlの範囲の成長因子(動物、動物組換体、ヒト組換体もしくは天然)

【請求項5】低温度~生理学的温度(2℃~38℃)にて眼組織の保存を維持し、品質を向上させる成分を含有すると共に生理学的pHを有し、下記a~pの成分の有効量を含むことを特徴とする無血清医療溶液。

40 a.

1. ミニマル・エッセンシャル・メジウム(MEM)

2. TC199メジウム

3. ミニマル・エッセンシャル・メジウム(MEM)

とTC199メジウムとの組合せ物

から選択される栄養分および電解質の水溶液

b.

1. 硫酸コンドロイチン

2. 硫酸デルマタン

3. 硫酸ヘパリン

50 4. 硫酸ヘパラン

5. 硫酸ケラタン

6. ヒアルuron酸

の群から選択される0.001mg/ml~1.0g/mlの範囲のグリコサミノグルカン

c.

1. デキストラン

2. 硫酸デキストラン

3. ヒドロキシプロピルメチルセルロース

4. カルボキシメチルセルロース

5. 細胞ガム

6. アルギン酸ナトリウム

7. アルブミン

8. ヒドロキシエチル澱粉

9. ヒドロキシエチルセルロース

10. デキストロース

11. グルコース

12. シクロデキストリン

の群から選択される0.001mg/ml~1.0g/mlの範囲のデツルゲッセント剤

d.

1. グルコース

2. ビルビン酸塩

3. 蔗糖

4. フラクトース

5. デキストロース

の群から選択される0.01mM~1.0mMの範囲のエネルギー源

e.

1. 重炭酸ナトリウム

2. 酢酸ナトリウム

3. クエン酸ナトリウム

4. 燐酸ナトリウム

5. HEPES緩衝剤

の群から選択される0.01mM~1.0mMの範囲の緩衝系

f.

1. L-アスコルビン酸

2. 2-メルカプトエタノール

3. グルタチオン

4. α -トコフェロール5. α -トコフェロールアセテート6. α -トコフェロールホスフェート

7. セレニウム

の群から選択される0.001 μ M~1.0mMの範囲の酸化防止剤

g.

1. ビタミンA

2. ビタミンB

3. レチノイン酸

4. トランスレチノイン酸

5. 酢酸レチノール

6. エタノールアミン

7. ホスフォエタノールアミン

8. トランスフェリン

9. レシチン

10. B-シトステロール

11. L- α -ホスファチジルコリン

の群から選択される0.001pg/ml~500mg/mlの範囲の膜安定化成分

10 h.

1. ゲンタマイシン

2. カナマイシン

3. ネオマイシン

4. バンコマイシン

5. オブラマイシン

6. クリシダマイシン

7. ストレプトマイシン

8. レボフロキサシン

9. ペニシリン

20

10. シクロスポリン

11. アンホテリシンB

12. ニスタチン

の群から選択される0.001 μ g/ml~100mg/mlの範囲の抗生物質および/または抗カビ剤

i.

1. アデノシン

2. イノシン

3. アデニン

4. フラビンアデニンジヌクレオチド

30

5. ウリジン5'-トリホスフェートNa

6. 5'-メチルシトシン

7. B-NAD (B-ニコチン酸アシドアデニンジヌクレオチド)

8. B-NADP Na (B-ニコチン酸アシドアデニンジヌクレオチドリナトリウム)

の群から選択される0.001mM~1.0mMの範囲のATPもしくはエネルギー前駆体

j.

1. アリニル-グルタミン

40

2. グリシル-グルタミン

3. L-アミノ- α -酪酸

4. L-アルギニン

5. D-ビオチン

6. ベタインHCl

7. D-カルニチン

8. カルシフェロール

9. カロチン

10. コレステロール

11. L-シスチン

50

12. L-システイン

13. L-グルタミン酸
14. D-グルコサミン
15. グルクロネート
16. D-グルクロノラクトン
17. L-ヒドロキシプロリン
18. ヒポキサンチン
19. L-イノシトール
20. グリシン
21. L-オルニチン
22. L-プロリン
23. L-セリン
24. ミオイノシトール
25. メナジオン
26. ナイアシン
27. ニコチン酸
28. p-アミノ安息香酸
29. D-パントテン酸
30. ピリドキサル-5-ホスフェート
31. ピリドキシンHCl
32. タウリン
33. チミジン
34. キサンチン
35. ビタミンB12

の群から選択される0.001 μ M~10mMの範囲の
栄養細胞補充剤

k.

1. アセチル補酵素A
2. コカルボキシラーゼ
3. 補酵素A
4. 補酵素Q10
5. 補酵素K

の群から選択される0.001 μ M~10mMの範囲の
補酵素および酵素補充剤

l.

1. 2'-デオキシアデノシン
2. 2'-デオキシシチジンHCl
3. 2'-デオキシグアノシン
4. 2'-デオキシー-D-リボース
5. D-リボース

の群から選択される0.001 μ M~10mMの範囲の
ヌクレオチド前駆体

m.

1. B-エストラジオール
2. プロゲステロン
3. テストステロン
4. コルチソール
5. コルチコステロン
6. チロキシン
7. 甲状腺刺激ホルモン
8. カルシトニン

の群から選択される0.001pg/ml~0.100
mg/mlの範囲のホルモン補充剤

n.

1. L-アラニン
2. L-アスパラギン
3. L-アスパラギン酸
4. L-グルタミン酸
5. グリシン
6. L-プロリン
7. L-セリン

の群から選択される0.001 μ g/ml~100mg
/mlの範囲の非必須アミノ酸

o.

1. CuSO₄·5H₂O
2. ZnSO₄·7H₂O
3. セレナイトNa
4. クエン酸第二鉄
5. MnSO₄·H₂O
6. NaSiO₃·9H₂O
7. モリブデン酸
8. NH₄VO₃
9. NiSO₄·6H₂O
10. SnCl₂
11. AgNO₃
12. Ba(C₂H₃O₂)₂
13. KBr
14. CdCl₂
15. CoCl₂
16. CrCl₃
17. NaF
18. GeO₂
19. KL
20. RbCl
21. ZrOCl₂·8H₂O

1. CuSO₄·5H₂O
2. ZnSO₄·7H₂O
3. セレナイトNa
4. クエン酸第二鉄
5. MnSO₄·H₂O
6. NaSiO₃·9H₂O
7. モリブデン酸
8. NH₄VO₃
9. NiSO₄·6H₂O
10. SnCl₂
11. AgNO₃
12. Ba(C₂H₃O₂)₂
13. KBr
14. CdCl₂
15. CoCl₂
16. CrCl₃
17. NaF
18. GeO₂
19. KL
20. RbCl
21. ZrOCl₂·8H₂O

の群から選択される0.001pg/ml~0.100
mg/mlの範囲の微量無機質および微量要素

p.

1. PDGF-BB
2. PDGF-AA
3. 神経成長因子
4. 神経成長因子B
5. 幹細胞因子
6. 形質転換成長因子- α
7. 形質転換成長因子-B
8. 血管内皮成長因子
9. B-内皮細胞成長因子
10. 表皮成長因子
11. 上皮ニュートロフィル活性化ペプチド
12. ヘパリン結合EGF様成長因子
13. 繊維芽細胞成長因子-酸性

14. 繊維芽細胞成長因子-塩基性
15. IGF-I
16. IGF-II
17. ケラチノサイト成長因子
18. 血小板由来内皮細胞成長因子
19. インシュリン
20. 肝細胞成長因子

の群から選択される0.001pg/ml~0.100mg/mlの範囲の成長因子(動物、動物組換体、ヒト組換体もしくは天然)

【請求項6】低温度~生理学的温度(16℃~38℃)にて眼組織の保存を維持し、品質を向上させる成分を含むと共に生理学的pHを有し、下記a~pの成分の有効量を含むことを特徴とする無血清医療溶液。

a.

1. ミニマル・エッセンシャル・メジウム(MEM)
2. TC199メジウム
3. ミニマル・エッセンシャル・メジウム(MEM)とTC199メジウムとの組合せ物

の群から選択される栄養分および電解質の水溶液

b.

1. 硫酸コンドロイチン
2. 硫酸デルマチン
3. 硫酸ヘパリン
4. 硫酸ヘパラン
5. 硫酸ケラタン
6. ヒアルuron酸

の群から選択される0.001mg/ml~1.0g/mlの範囲のグリコサミノグルカン

c.

1. デキストラン
2. 硫酸デキストラン
3. ヒドロキシプロピルメチルセルロース
4. カルボキシメチルセルロース
5. 細胞ガム
6. アルギン酸ナトリウム
7. アルブミン
8. ヒドロキシエチル澱粉
9. ヒドロキシエチルセルロース
10. デキストロース
11. グルコース
12. シクロデキストリン

の群から選択される0.001mg/ml~1.0g/mlの範囲のデツルゲッセント剤

d.

1. グルコース
2. ビルビン酸塩
3. 蔗糖
4. フラクトース
5. デキストロース

の群から選択される0.01mM~10mMの範囲のエネルギー源

e.

1. 重炭酸ナトリウム
2. 酢酸ナトリウム
3. クエン酸ナトリウム
4. 燐酸ナトリウム
5. HEPES緩衝剤

の群から選択される0.01mM~10mMの範囲の緩衝系

f.

1. L-アスコルビン酸
2. 2-メルカプトエタノール
3. グルタチオン
4. α -トコフェロール
5. α -トコフェロールアセテート
6. α -トコフェロールホスフェート
7. セレンウム

の群から選択される0.001 μ M~10mMの範囲の

20 酸化防止剤

g.

1. ビタミンA
2. ビタミンB
3. レチノイン酸
4. トランスレチノイン酸
5. 酢酸レチノール
6. エタノールアミン
7. ホスホエタノールアミン
8. トランスフェリン

30

9. レシチン
10. B-シトステロール
11. L- α -ホスファチジルコリン

の群から選択される0.001pg/ml~500mg/mlの範囲の膜安定化成分

h.

1. ゲンタマイシン
2. カナマイシン
3. ネオマイシン
4. バンコマイシン
5. オブラマイシン
6. クリンダマイシン
7. ストレプトマイシン
8. レボフロキサシン
9. ペニシリン
10. シクロスポリン
11. アンホテリシンB
12. ニスタチン

の群から選択される0.001 μ g/ml~100mg/mlの範囲の抗生物質および/または抗カビ剤

50 i.

1. アデノシン
 2. イノシン
 3. アデニン
 4. フラビンアデニンジスクレオチド
 5. ウリジン5'-トリホスフェートNa
 6. 5'-メチルシトシン
 7. B-NAD (B-ニコチン酸アシドアデニンジスクレオチド)
 8. B-NADP Na (B-ニコチン酸アシドアデニンジスクレオチドリナトリウム)
- の群から選択される0.001mM~10mMの範囲のATPもしくはエネルギー前駆体

- j.
1. アリニル-グルタミン
 2. グリニル-グルタミン
 3. L-アミノ-n-酪酸
 4. L-アルギニン
 5. D-ビオチン
 6. ベタインHCl
 7. D-カルニチン
 8. カルシフェロール
 9. カロチン
 10. コレステロール
 11. L-シスチン
 12. L-システイン
 13. L-グルタミン酸
 14. D-グルコサミン
 15. グルクロネート
 16. D-グルクロノラクトン
 17. L-ヒドロキシプロリン
 18. ヒポキサンチン
 19. L-イノシトール
 20. グリシン
 21. L-オルニチン
 22. L-プロリン
 23. L-セリン
 24. ミオイノシトール
 25. メナジオン
 26. ナイアシン
 27. ニコチン酸
 28. p-アミノ安息香酸
 29. D-パントテン酸
 30. ピリドキサール-5-ホスフェート
 31. ピリドキシンHCl
 32. タウリン
 33. チミジン
 34. キサンチン
 35. ビタミンB12
- の群から選択される0.001μM~10mMの範囲の栄養細胞補充剤

- k.
1. アセチル補酵素A
 2. コカルボキシラーゼ
 3. 補酵素A
 4. 補酵素Q10
 5. 補酵素K
- の群から選択される0.001μM~10mMの範囲の補酵素および酵素補充剤
- l.
1. 2'-デオキシアデノシン
 2. 2'-デオキシシチジンHCl
 3. 2'-デオキシグアノシン
 4. 2-デオキシ-D-リボース
 5. D-リボース
- の群から選択される0.001μM~10mMの範囲のスクレオチド前駆体
- m.
1. B-エストラジオール
 2. プロゲステロン
 3. テストステロン
 4. コルチソール
 5. コルチコステロン
 6. チロキシ
 7. 甲状腺刺激ホルモン
 8. カルシトニン
- の群から選択される0.001pg/ml~0.100mg/mlの範囲のホルモン補充剤
- n.
1. L-アラニン
 2. L-アスパラギン
 3. L-アスパラギン酸
 4. L-グルタミン酸
 5. グリシン
 6. L-プロリン
 7. L-セリン
- の群から選択される0.001μg/ml~100mg/mlの範囲の非必須アミノ酸
- o.
1. CuSO₄・5H₂O
 2. ZnSO₄・7H₂O
 3. セレナイトNa
 4. クエン酸第二鉄
 5. MnSO₄・H₂O
 6. NaSiO₃・9H₂O
 7. モリブデン酸
 8. NH₄VO₃
 9. NiSO₄・6H₂O
 10. SnCl₂
 11. AgNO₃
 12. Ba(C₂H₃O₂)₂

13. KBr
14. CdCl₂
15. CoCl₂
16. CrCl₃
17. NaF
18. GeO₂
19. KL
20. RbCl
21. ZrOCl₂・8H₂O

の群から選択される0.001pg/ml～0.100mg/mlの範囲の微量無機質および微量元素

- p.
1. PDGF-BB
 2. PDGF-AA
 3. 神経成長因子
 4. 神経成長因子B
 5. 幹細胞因子
 6. 形質転換成長因子-α
 7. 形質転換成長因子-B
 8. 血管内皮成長因子
 9. B-内皮細胞成長因子
 10. 表皮成長因子
 11. 上皮ニュートロフィル活性化ペプチド
 12. ヘパリン結合EGF様成長因子
 13. 繊維芽細胞成長因子-酸性
 14. 繊維芽細胞成長因子-塩基性
 15. IGF-I
 16. IGF-II
 17. ケラチノサイト成長因子
 18. 血小板由来内皮細胞成長因子
 19. インシュリン
 20. 肝細胞成長因子

の群から選択される0.001pg/ml～0.100mg/mlの範囲の成長因子（動物、動物組換え体、ヒト組換え体もしくは天然）

【請求項7】下記a～oの成分の有効量を含むことを特徴とする無血清医療溶液。

- a. 栄養分および電解質の水溶液
- b. グリコサミノグルカン
- c. デツルゲッセント剤
- d. エネルギー源
- e. 緩衝系
- f. 酸化防止剤
- g. 膜安定化剤
- h. 抗生物質もしくは抗カビ剤
- i. ATPもしくはエネルギー前駆体
- j. 栄養細胞補充剤
- k. 補酵素および酵素補充剤
- l. スクレオチド前駆体
- m. ホルモン補充剤

- n. 非必須アミノ酸
- o. 微量無機質および微量元素

【請求項8】下記a～oの成分の有効量を含むことを特徴とする無血清医療溶液。

- a.
 1. ミニマル・エッセンシャル・メジウム (MEM)
 2. TC199メジウム
 3. ミニマル・エッセンシャル・メジウム (MEM) とTC199メジウムとの組合せ物

の群から選択される栄養分および電解質の水溶液

- b.
 1. 硫酸コンドロイチン
 2. 硫酸デルマチン
 3. 硫酸ヘパリン
 4. 硫酸ヘパラン
 5. 硫酸セラタン
 6. ヒアルuron酸

の群から選択される0.001mg/ml～1.0g/mlの範囲のグリコサミノグルカン

- 20 c.
 1. デキストラン
 2. 硫酸デキストラン
 3. ヒドロキシプロピルメチルセルロース
 4. カルボキシメチルセルロース
 5. 細胞ガム
 6. アルギン酸ナトリウム
 7. アルブミン
 8. ヒドロキシエチル澱粉
 9. ヒドロキシエチルセルロース
 10. デキストロース
 11. グルコース
 12. シクロデキストリン

の群から選択される0.001mg/ml～1.0g/mlの範囲のデツルゲッセント剤

- d.
 1. グルコース
 2. ビルビン酸塩
 3. 蔗糖
 4. フラクトース
 5. デキストロース
- の群から選択される0.01mM～10mMの範囲のエネルギー源

- e.
 1. 重炭酸ナトリウム
 2. 酢酸ナトリウム
 3. クエン酸ナトリウム
 4. 磷酸ナトリウム
 5. HEPES緩衝剤
- の群から選択される0.01mM～10mMの範囲の緩衝系

f.

1. L-アスコルビン酸
2. 2-メルカプトエタノール
3. グルタチオン
4. α -トコフェロール
5. α -トコフェロールアセテート
6. α -トコフェロールホスフェート
7. セレニウム

の群から選択される0.001 μ M~10mMの範囲の酸化防止剤

g.

1. ビタミンA
2. ビタミンB
3. レチノイン酸
4. トランスレチノイン酸
5. 酢酸レチノール
6. エタノールアミン
7. ホスホエタノールアミン
8. トランスフェリン
9. レシチン
10. B-シトステロール
11. L- α -ホスファチジルコリン

の群から選択される0.001pg/ml~500mg/mlの範囲の膜安定化成分

h.

1. ゲンタマイシン
2. カナマイシン
3. ネオマイシン
4. バンコマイシン
5. オブラマイシン
6. クリンダマイシン
7. ストレプトマイシン
8. レボフロキサシン
9. ペニシリン
10. シクロスポリン
11. アンホテリシンB
12. ニスタチン

の群から選択される0.001 μ g/ml~100mg/mlの範囲の抗生物質および/または抗カビ剤

i.

1. アデノシン
2. イノシン
3. アデニン
4. フラビンアデニンジヌクレオチド
5. ウリジン5'-トリホスフェートNa
6. 5'-メチルシトシン
7. B-NAD (B-ニコチン酸アシドアデニンジヌクレオチド)
8. B-NADP Na (B-ニコチン酸アシドアデニンジヌクレオチドリン酸ナトリウム)

の群から選択される0.001mM~10mMの範囲のATPもしくはエネルギー前駆体

j.

1. アリニル-グルタミン
2. グリシル-グルタミン
3. L-アミノ-n-酪酸
4. L-アルギニン
5. D-ビオチン
6. ベタインHCl

10

7. D-カルニチン
8. カルシフェロール
9. カロチン

20

10. コレステロール
11. L-シスチン
12. L-システイン
13. L-グルタミン酸
14. D-グルコサミン
15. グルクロネート
16. D-グルクロノラクトン
17. L-ヒドロキシプロリン
18. ヒポキサンチン
19. L-イノシトール
20. グリシン

30

21. L-オルニチン
22. L-プロリン
23. L-セリン
24. ミオイノシトール
25. メナジオン
26. ナイアシン
27. ニコチン酸
28. p-アミノ安息香酸
29. D-バントテン酸
30. ビリドキサール-5-ホスフェート
31. ビリドキシンHCl
32. タウリン
33. チミジン
34. キサンチン
35. ビタミンB12

40

栄養細胞補充剤

k.

1. アセチル補酵素A
2. コカルボキシラーゼ
3. 補酵素A
4. 補酵素Q10
5. 補酵素K

の群から選択される0.001 μ M~10mMの範囲の補酵素および酵素補充剤

50

1. 2'-デオキシアデノシン

2. 2'-デオキシシチジンHCL
3. 2'-デオキシグアノシン
4. 2-デオキシ-D-リボース
5. D-リボース

の群から選択される0.001 μ M~10mMの範囲のヌクレオチド前駆体

m.

1. B-エストラジオール
2. プロゲステロン
3. テストステロン
4. コルチソール
5. コルチコステロン
6. チロキシン
7. 甲状腺刺激ホルモン
8. カルシトニン

の群から選択される0.001pg/ml~0.100mg/mlの範囲のホルモン補充剤

n.

1. L-アラニン
2. L-アスパラギン
3. L-アスパラギン酸
4. L-グルタミン酸
5. グリシン
6. L-プロリン
7. L-セリン

の群から選択される0.001 μ g/ml~100mg/mlの範囲の非必須アミノ酸

o.

1. CuSO₄·5H₂O
2. ZnSO₄·7H₂O
3. セレナイトNa
4. クエン酸第二鉄
5. MnSO₄·H₂O
6. NaSiO₃·9H₂O
7. モリブデン酸
8. NH₄VO₃
9. NiSO₄·6H₂O
10. SnCl₂
11. AgNO₃
12. Ba(C₂H₃O₂)₂
13. KBr
14. CdCl₂
15. CoCl₂
16. CrCl₃
17. NaF
18. GeO₂
19. KL
20. RbCl
21. ZrOCl₂·8H₂O

の群から選択される0.001pg/ml~0.100

mg/mlの範囲の微量無機質および微量要素

【請求項9】一種類以上の下記a~pの成分の有効量を含むことを特徴とする無血清医療溶液。

- a. 栄養分および電解質の水溶液
- b. グリコサミノグルカン
- c. デツルゲッセント剤
- d. エネルギー源
- e. 緩衝系
- f. 酸化防止剤
- 10 g. 膜安定化剤
- h. 抗生物質もしくは抗カビ剤
- i. ATPもしくはエネルギー前駆体
- j. 栄養細胞補充剤
- k. 補酵素および酵素補充剤
- l. ヌクレオチド前駆体
- m. ホルモン補充剤
- n. 非必須アミノ酸
- o. 微量無機質および微量要素
- p. 成長因子(動物、動物組換え体、ヒト組換え体もしくは天然)

【請求項10】請求項9記載の医薬組成物からなる無血清医療溶液において、前記溶液を接触させた後、哺乳動物の眼組織の保存の維持および向上がなされることを特徴とする無血清医療溶液。

【請求項11】請求項9記載の医薬組成物からなる無血清医療溶液において、レーザーの外科的使用の前もしくは後に前記溶液を接触させた後、哺乳動物の眼組織の保存の維持および向上がなされることを特徴とする無血清医療溶液。

30 【請求項12】請求項9記載の医薬組成物からなる無血清医療溶液において、眼が退化した状態になる前もしくは後に前記溶液を接触させた後、哺乳動物の眼組織の保存の維持および向上がなされることを特徴とする無血清医療溶液。

【請求項13】請求項9記載の医薬組成物からなる無血清医療溶液において、手術の前もしくは後に前記溶液を接触させた後、哺乳動物の眼組織の保存の維持および向上がなされることを特徴とする無血清医療溶液。

40 【請求項14】請求項9記載の医薬組成物からなる無血清医療溶液において、前記溶液を接触させた後、哺乳動物の組織の保存の維持および向上がなされることを特徴とする無血清医療溶液。

【請求項15】ドナーから組織を摘出してレシピエントに移植する間に経過する期間に渡って前記組織を請求項1~14のいずれか1項に記載の無血清医療溶液と接触させ続けることを特徴とする眼手術に使用するための眼組織の処置方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は規定された無血清医

療溶液における眼組織の保存に関し、より詳細にはドナーからの摘出と移植との間として特定された時間におけるヒト角膜組織の保存および品質向上に関するものである。

【0002】

【従来の技術】角膜移植は、角膜障害に罹患した多くの人の視覚リハビリテーションに有効である。この手法は、一般的に、ドナー組織の安定した入手ができないことが大きな障害になっている。コンドロイチン硫酸塩を含有する4℃の角膜保存媒体を使用した場合には、高品質のドナー組織の入手が極めて困難である。米国においては、移植される全角膜の95%は4℃のコンドロイチン硫酸塩を含有する媒体に7日間保存される。角膜が96時間保存された場合には、角膜ストロマが大きく膨張することから諒解されるように、角膜に上皮分解および角膜透明度の損失が生じる。ストロマ浮腫は角膜内皮のバリアポンプ機能および角膜上皮のバリア機能の維持低下の両者に起因する。

【0003】4℃の角膜保存の別の方法は、器官培養の使用である。この角膜保存方法においては、角膜はより高い温度(31℃~37℃)にて維持されて角膜の一層大きい代謝活性を可能にする。器官培養された角膜の使用は、主としてヨーロッパで支持されている。器官培養システムは、主たる媒体成分としてウシ胎児血清を用いる。ボビン・スポンギホルム・エンセファロフィー(BSE)の集団発生から派生したTSE(トランスミッシブル・スポンギホルム・エンセファロパシス)に対して高まっている懸念は、角膜保存における動物由来の生成物およびその使用に関して重点的に焦点を当てたものである。角膜保存における血清成分の組み換えは、血清中の既知の化学成分が350種を超えて存在することから、驚異的なチャレンジである。

【0004】高い温度(31℃~37℃)を使用する培養技術では、4℃で保存された角膜と比較して角膜の代謝速度が高められる。角膜保存媒体は、生体内における状態と同様な環境にしなければならない。無血清角膜保存媒体は、通常血清中に存在する各成分を保管するように完全に規定されなければならない。各保存媒体に関し、イオンおよびアミノ酸組成、重炭酸塩平衡、利用可能なエネルギー源、溶解された酸素レベル、栄養細胞補充物、補酵素および酵素補充剤、ヌクレオチド前駆体、ホルモン補充剤、微量無機質、微量元素、成長因子、浸透率およびpHのような重要な生理学的パラメータの評価を行うことが必要である。無血清器官培養物の保存を延長させるパラメータは、保存の際に生ずる細胞損傷の可逆性に関し規定されるべきである。

【0005】成人の角膜内皮は再生能力が限定されており、細胞分裂の様子は生体内ではほとんど観察されていない。生体内におけるヒトの角膜内皮は、通常、外傷に反応して細胞移動により外傷領域にスライドする。しか

しながら、生体内の内皮細胞分裂がウサギ、ウシおよびヒトの内皮に確認されている。生体内における角膜の低温外傷または機械的外傷後のオートラジオグラフィによるチミジン吸収の研究は、内皮モノレイヤーにおける細胞分裂特性の存在を示している。これらの研究は全て血清を用いて行われた。外科的外傷および病気は内皮細胞の損失を加速させると共に角膜を傷つけうる。従って、角膜内皮の長期間の保存および品質向上は、眼組織のアイバンク保存の観点から極めて重要である。

10 【0006】角膜組織の保存および取り扱いに関する問題点の概説は、フェデリック・S・ブライツビル、M・D・により編集され、ミズーリ州、セントルイスのC・V・モスピー・カンパニーにより1986年に出版されたコルニアル・サージェリー、第1~4章、第1~128頁に述べられている。各種の保存媒体および技術が提案されており、ドナー組織の品質を維持すると共に実際に向上させ、ドナーからの摘出と移植との間の時間として規定される角膜組織の保存期間を増大させる方向で現在研究が継続されている。現在、31℃~38℃にて器官培養技術で使用される規定された無血清媒体は存在しない。

【0007】従って、本発明は、眼組織、特に角膜組織を移植に先立って保存する際に、品質を向上させる材料および方法に関するものである。本発明の一観点によれば、正常な生理学的代謝を維持すると共に血清を含有する媒体と同等に角膜組織を維持することが可能な完全に規定された無血清媒体を提供することにより角膜組織生存率を向上させる。

【0008】

30 【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の課題は、特に31℃~38℃にて器官培養技術で使用する規定された無血清媒体を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】31℃~37℃における器官培養角膜保存によって、内皮の機能状態を持続させる組織保存が可能になるべきである。実験が示したところでは、規定された無血清医療溶液は血清を含有する溶液と同等に角膜を維持することができる。血清含有溶液における望ましくない保存の属性は回避される。本発明は、器官培養に際し角膜組織を維持するのに必要な規定された成分を規定する。さらに本発明は、角膜にグリコサミノグルカン、デツルゲッセント(deturgescant) 40 剤、エネルギー源、緩衝系、酸化防止剤、膜安定化剤、抗生物質および/または細胞分裂抑制剤、ATPもしくはエネルギー前駆体、栄養細胞補充剤、補酵素および酵素補充剤、ヌクレオチド前駆体、ホルモン補充剤、非必須アミノ酸、微量無機質、微量元素、および成長因子を与えて細胞代謝、外傷治療および細胞生存率を向上させる栄養溶液を規定する。細胞増殖はDNA合成をもたらし現象により規制される。細胞がDNA合成と共に進行

するか、或いは細胞サイクルの初期段階で停止するかどうかは細胞外の条件に依存する。細胞代謝はヘキソーズ移動、蛋白質合成、アミノ酸およびイオンの移動を増大させることによる必須栄養成分の添加により向上させることができる。

【0010】新規に規定された栄養含有溶液は無血清である。これらの溶液はヒト角膜保存溶液として使用することができ、ヒト角膜を血清含有溶液と同等に維持する。血清補充された溶液は組織培養にてヒト角膜細胞における細胞分裂を刺激しうが、ヒト移植のための組織と共に使用するための物質における血清の存在には多くの欠点がある。血清はたとえばウィルス病、特に顕著にはTSE（トランスミッシブル・スポンジホルム・エンセファロパシス）のような多くの病気の伝染物質となりうる。非ヒト由来の血清は、免疫反応を引き起こしうる多くの物質を含有し、全ての血清はたとえばエンドトキシンのような或る種の物質および細胞分裂を実際に阻害する成長因子を含有する。角膜保存溶液については、よく知られている。4℃で保存するための無血清角膜保存媒体は、オプチソルよりなり、パウシ・アンド・ロンプ、サージカル社（アービン、カルフォルニア州）から市販されている「オプチソルーGS」を入手することができる。これら媒体はD. L. スケルニク（B. S.）およびR. L. リンドストローム（M. D.）により開発された。器官培養のための血清含有媒体は、オプシア社（フランス）から市販で入手することができる。器官培養のための無血清媒体は、入手することができないか、或いは現在使用されていない。

【0011】栄養分および電解質溶液は、組織培養の技術分野にて十分に規定されている。この種の溶液は、細胞維持および細胞成長に必要な最小濃度にて必須栄養分および電解質を含有する。実際の溶液組成は、大幅に変更されることがある。一般にこれらは無機塩、たとえばカルシウム、マグネシウム、鉄、ナトリウムおよびカリウムの炭酸塩、硝酸塩、リン酸塩、塩化物など、並びに必須および非必須アミノ酸および他の必須栄養分を含有する。化学的に規定された基礎栄養媒体は、たとえばギブコBRL社（ギランド・アイランド、ニューヨーク州）およびシグマ社（セントルイス、ミズーリ州）から「ミニマル・エッセンシャル・メジウム（MEM）」および「TC199」の名称で市販されている。角膜保存溶液は、これらの栄養媒体に適している。本発明で規定された無血清医療溶液は、「MEM」および「TC199」の両者に存在する各成分に、グリコサミノグルカン、デ

【0012】

【発明の実施の形態】本発明の他の目的および本発明に付随する多くの利点は、添付の図面と併せて以下の詳細な説明を参照することにより一層よく理解できるであろう。

【0013】図1には本発明の組成物および方法に使用するのに好適な規定された無血清医療溶液が示されている。本無血清医療溶液は以下の成分を含む。

【0014】栄養分および電解質の水溶液（たとえばミニマル・エッセンシャル・メジウムおよび／またはTC199媒体

グリコサミノグルカン（たとえばコンドロイチン硫酸塩、デルマチン硫酸塩、ヘパリン硫酸塩、ヘパラン硫酸塩、ケラタン硫酸塩および／またはヒアルuron酸）を0.001mg/ml～1.0g/mlの範囲

デツルゲッセント剤（たとえばデキストラン、デキストラン硫酸塩、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、細胞ガム質、アルギン酸ナトリウム、アルブミン、ヒドロキシエチル澱粉、ヒドロキシエチルセルロース、デキストロース、グルコースおよび／またはシクロデキストリン）を0.001mg/ml～1.0g/mlの範囲

エネルギー源（グルコース、ピルビン酸塩、蔗糖、フラクトースおよび／またはデキストロース）を0.01～10mMの範囲

緩衝系（たとえば重炭酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムおよび／またはHEPES緩衝剤）を0.01～10mMの範囲

酸化防止剤（たとえばL-アスコルビン酸、2-メルカプトエタノール、グネタチオン、 α -トコフェロール、 α -トコフェロール酢酸塩、 α -トコフェロールリン酸塩および／またはセレンウム）を0.001 μ M～10mMの範囲

膜安定化成分（たとえばビタミンA、ビタミンB、レチノイン酸、トランスレチノイン酸、酢酸レチノール、エタノールアミン、ホスフォエタノールアミン、トランスフェリン、レシチン、B-シトステロールおよび／またはL- α -ホスファチジルコリン）を0.001pg/ml～500mg/mlの範囲

抗生物質および／または細胞分裂抑制剤（たとえばゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、バンコマイシン、トブラマイシン、クリンダマイシン、ストレプトマイシン、レボフロキサシン、ペニシリン、シクロスポリン、アンフォテリシンBおよび／またはニスタチン）を0.001 μ g/ml～100mg/mlの範囲

ATPもしくはエネルギー前駆体（たとえばアデノシン、イノシン、アデニン、フラビンアデニンジヌクレオチド、ウリジン5'-トリホスフェートNa、5'-メチルシトシン、B-ニコチン酸アシドアデニンジヌクレオチドおよび／またはB-ニコチン酸アシドアデニンジヌ

クレオチドリル酸ナトリウム)を0.001~10mMの範囲

栄養細胞補充剤(たとえばアリニルグルタミン、グリシルグルタミン、L-アミノ-n-酪酸、L-アルギニン、D-ビオチン、ヘタインHCl、D-カルニチン、カルシフェロール、カロチン、コレステロール、L-シスチン、L-システイン、L-グルタミン酸、D-グルコサミン、グルクロネート、D-グルクロノラクトン、L-ヒドロキシプロリン、ヒポキサンチン、L-イノシトール、グリシン、L-オルニチン、L-プロリン、L-セリン、ミオイノシトール、メナジオン、ナイアシン、ニコチン酸、p-アミノ安息香酸、D-パントテン酸、ピリドキサル-5-ホスフェート、ピリドキシンHCl、タウリン、チミジン、キサンチンおよび/またはビタミンB12)を0.001μM~10mMの範囲

補酵素および酵素補充剤(たとえばアセチル補酵素A、コカルボキシラーゼ、補酵素A、補酵素Q10および/または補酵素K)を0.001μM~10mMの範囲
ヌクレオチド前駆体(たとえば2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシシチジンHCl、2'-デオキシグアノシン、2'-デオキシ-D-リボースおよび/またはD-リボース)を0.001μM~10mMの範囲

ホルモン補充剤(たとえばB-エストラジオール、プロゲステロン、テストステロン、コルチソール、コルチコステロン、チロキシン、甲状腺刺激性ホルモンおよび/またはカルシトニン)を0.001pg/ml~100mg/mlの範囲
非必須アミノ酸(たとえばL-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-プロリンおよび/またはL-セリン)を0.001μg/ml~100mg/mlの範囲

微量無機質および微量元素(たとえばCuSO₄·5H₂O、ZnSO₄·7H₂O、セレン酸Na、クエン酸第二鉄、MnSO₄·H₂O、Na₂SiO₃·9H₂O、モリブデン酸、NH₄VO₃、NiSO₄·6H₂O、SnCl₂、AgNO₃、Ba(C₂H₃O₂)₂、KBr、CdCl₂、CoCl₂、CrCl₃、NaF、GeO₂、K₂、RbCl、ZrOCl₂·8H₂O)を0.001pg/ml~0.100mg/mlの範囲

成長因子(動物、動物組換え体、ヒト組換え体もしくは天然産)、(PDGF-BB、PDGF-AA、神経成長因子、ステム細胞因子、形質転換用成長因子-α、形質転換用成長因子-B、血管内皮成長因子、B-内皮細胞成長因子、外皮成長因子、外皮ニュートロフィル活性化ペプチド、ヘパリン結合性EGF様成長因子、繊維芽細胞成長因子-酸性、繊維芽細胞成長因子-塩基性、IGF-I、IGF-II、ケラチノサイト成長因子、血小板誘導内皮細胞成長因子、インシュリン)を0.001pg/ml~0.100mg/mlの範囲

本発明の無血清医療溶液はグリコサミノグルカン、デツルゲッセンツ剤、エネルギー源、緩衝系、酸化防止剤、膜安定化剤、抗生物質および/または抗カビ剤、ATPもしくはエネルギー前駆体、栄養細胞補充剤、補酵素および酵素補充剤、ヌクレオチド前駆体、ホルモン補充剤、非必須アミノ酸、微量無機質、微量要素、および成長因子が、器官培養保存後の細胞代謝、細胞生存率および外傷治癒を向上させるのに十分な量で補充された規定の栄養分および電解質水溶液で構成される。摘出された角膜は角膜保存溶液の容器に無菌的に移され、次いで封止される。これら角膜は2℃~38℃、好適には31℃~37℃にて保存される。これら角膜は、14日目に媒体を交換して28日間まで保存される。角膜は、移植の時点で、角膜デツルゲッセンツを含有する溶液で薄くする。移植の時点で、通常角膜デツルゲッセンツは手術の間および術後にも維持される。内皮機能および代謝が維持されて、角膜を永久的に水和することにより術後の一定の厚さおよび透明性が維持される。移植のための生存角膜を提供する他に、外傷治癒も強化される。本発明の範囲を逸脱することなく、各種の変更を行うことができる。例えば無血清医療溶液を任意の医療用途に使用することができ、眼科のみに限定されない。以下実施例により本発明をさらに説明するが、これは限定を意図するものでなく、眼科のみに限定されない。

操作の方式

器官培養保存は、角膜内皮の機能状態を維持するように組織を保持しなければならない。下記の表1に示したそれぞれの成分を、ヒト角膜内皮とヒト角膜実質(stromal keratocytes)とヒト角膜上皮細胞とを用いて最適濃度を決定すべく細胞培養モデルにて試験した。以下の実施例は、処方物がこれら細胞種類に対して及ぼした効果を示す最終処方に基づくものである。細胞培養モデルにて最適濃度が得られた後、試験処方物をヒト角膜に対して試験した。

実施例1

ヒト角膜内皮細胞に対する規定された無血清医療溶液および血清含有媒体の効果標準器官培養媒体は、2.0%の胎児ウシ血清(FBS)が補充されたMEMを用いる。器官培養に使用される無血清媒体は、2.0%のFBSが補充されたMEMに等しいヒト角膜内皮細胞の増殖を維持せねばならない。この試験は無血清MEMに対するヒト角膜内皮細胞の増殖において規定の無血清医療溶液(表1)を評価すべく行い、MEMは2.5%のFBS、5.0%のFBS、10%のFBSおよび市販オプテソールGS(Optisol-GS)を含有した。各試験溶液を、ヒト角膜内皮細胞(HCE)を用い蛍光性カルセインAMバイオアッセイにて評価した。本出願人の実験室で開発された分離技術は、ヒト角膜内皮細胞の一次サブ培養およびその後のサブ培養の確立を可能にした。生体外条件は、これらヒト角膜内皮細胞を活発に細胞分

裂を行う増殖状態に維持する。細胞培養は、これら細胞を検討しうるモデル系を与える。カルセインエステラーゼ定量により測定して、内皮細胞における細胞分裂の刺激もしくは抑制に対する各種の試験溶液の効果を決定すべく定量バイオアッセイが開発されている。蛍光性カルセインAMバイオアッセイを用いて、細胞数に正比例する全エステラーゼ酵素活性を測定した。ウィルコクソンの符号化順位検定を用いて、試験群と比較群との間の統計的有意性 ($p < 0.05$) を評価した。この試験はミネソタ州、ミネアポリスのインサイト・ビオメド・インコーポレーション社にて行った。

カルセインAM蛍光定量バイオアッセイ

生存細胞は、遍在する細胞内エステラーゼ活性の存在により識別されるが、これは実質的に非蛍光性の細胞透過性カルセインAMから強蛍光性カルセインへの酵素変換により測定した。ポリアニオン性カルセインは生存細胞内に良好に保存されて、生存細胞内に強力かつ均質な緑色 (530 nm) 蛍光を発生する。

カルセインAM (非蛍光性) + エステラーゼ = カルセイン (蛍光性生成物)

カルセインAMのエステラーゼ生成物であるカルセインは、生存細胞により一層良好に保存されると共にBCE *

結果

2.5% ($p < 0.05$) と比較した統計的有意性

RFU (相対蛍光単位)

MEM	2356 ± 96	あり	0.0022	未満
オブチソルーGS	2339 ± 184	あり	0.0022	未満
無血清 (表1)	4460 ± 205	あり	0.0022	より大
無血清 (表1)	4474 ± 168	あり	0.0022	より大
MEM2.5%FBS	3832 ± 122			
MEM5.0%FBS	4554 ± 141	あり	0.0022	より大
MEM10%FBS	5031 ± 163	あり	0.0022	より大

検討

この試験は、2.5%のFBS、5.0%のFBS、10%のFBSおよび市販のオブチソルーGSを含有する無血清MEMに対しヒト角膜内皮細胞成長のための規定された無血清医療溶液 (表1) を評価すべく行った。各試験溶液を、ヒト角膜内皮細胞 (HCE) を用い蛍光性カルセインAMバイオアッセイにて評価した。カルセインエステラーゼ定量により測定して、内皮細胞における細胞分裂の刺激もしくは抑制に対する各種試験溶液の効果を決定すべく定量バイオアッセイが開発されている。蛍光性カルセインAMバイオアッセイを用いて、細胞数に正比例する全エステラーゼ酵素活性を測定した。ウィルコクソンの符号化順位検定を用いて、試験群と対照群との間の統計的有意性 ($p < 0.05$) を評価した。

【0015】溶液MEMおよびオブチソルーGSで培養したヒト角膜内皮細胞は、MEM2.5%FBS比較媒体と対比し全カルセイン蛍光性にて統計上有意な減少を示した。規定された無血清医療溶液 (表1) で培養したヒ

*CFよりも2.5倍明るい極性蛍光性誘導体である。励起および放出の最大値はそれぞれ485 nmおよび530 nmである。

ヒト角膜内皮細胞培養

96ウェル組織培養プレートに、200 μ lの所定媒体の最終容積にて 1×10^3 細胞/ウェルをシーディングした。第3代目のHCE細胞を湿潤化された培養器内に35.5℃で95%空気および5%CO₂の雰囲気維持した。10%胎児ウシ血清が補充されたCSMで1日間培養した後、媒体を取り出した。次いで細胞を1回洗浄し、適当な試験溶液または対照溶液で培養した。HCE細胞を72時間にわたり培養した。各時間間隔の終了後、各ウェルを200 μ lのデュルベッコ改変磷酸塩緩衝塩水で2回洗浄した。次いでHCE細胞を100 μ l/ウェルの2 μ MカルセインAM溶液 (モレキュラ・ブロープス・インコーポレーション社、ユーゲン、オレゴン州) で培養し、直ちにミリポア・サイトフルオル (商標) 2300蛍光測定装置で読み取った。485/20 nm励起波長および530/25 nm放出波長のフィルタ試験 (感度5) を用いて蛍光生成物を測定した。ウィルコクソンの符号化順位検定を用いて、試験群と対照群との間の統計的有意性 ($p < 0.05$) を評価した。

ト角膜内皮細胞は、MEM2.5%FBS比較媒体と対比し全カルセイン蛍光性にて統計上有意な増加を示した。MEM5.0%FBSおよびMEM10.0%FBSで培養したヒト角膜内皮細胞は、MEM2.5%FBS比較媒体と対比し全カルセイン蛍光性にて統計上有意な増加を示した。このデータから導かれる結論として、規定された無血清医療溶液 (表1) は、MEM2.5%FBS比較媒体より統計上大きな全カルセイン蛍光性 (HCE細胞の全数) を維持することができた。従って、このバイオアッセイのパラメータにより規定される溶液は、ヒト角膜移植用の角膜保存溶液として器官培養に使用するため許容される。

実施例2

ヒト角膜内皮細胞に対する無血清医療溶液と標準MEM2%FBS媒体との比較ヒトドナー角膜を正常塩水における1%ポビドンヨードに3分間浸漬し、正常食塩水に1分間浸漬した。次いで眼球を12 ccの正常食塩水で、18ゲージ針が装着された注射器により洗浄した。

移植に不適当な年齢もしくは死亡原因のドナーからの20対の角膜を認定アイバンクにて死亡後の平均12.0時間で摘出し、4℃の市販のオプチソル-GS（ボシロム、サージカル社）に保存した。ドナーの眼球は研究所へ輸送した。各対の一方を100mlの無血清（表1）媒体に入れた。他方の角膜を、L-グルタミン、HEPES、ペニシリン、ストレプトマイシン、アンフォテシンBおよび2%FBSを含有する50mlのMEMに入れた。各角膜を4.0シルク縫合糸で懸架した。各角膜を保存するそれぞれのビンを密閉すると共に、35℃にて14日間保存した。この時点で10対の角膜を取り出し、好適な新しい媒体に入れると共にさらに14日間保存した。14日目および28日目の時点で、無血清（表1）媒体に保存した角膜を次いで35℃の市販のオプチソル-GSに24時間保存した。MEM2%FBSに保存した対となる角膜は、6%T500デキストランを含有するMEMに35℃にて24時間保存した。高められた温度における角膜の水和増加のため、角膜はこの手順により薄くする必要がある。各角膜を薄くした後に、次の方法により評価した。角膜の厚さをマイクロメータでの顕微鏡評価により測定した。角膜内皮は、最終的な角膜の厚さを測定した後に0.1%トリパンブルーおよびアリザリンレッドSで染色することにより評価した。14日間の培養期間における角膜厚さは、それぞれ無血清（表1）媒体およびMEM2%につき0.386±0.49mmおよび0.479±0.078mmであった。無血清（表1）媒体に保存した角膜は、MEM2%FBS媒体に保存した角膜よりも角膜厚さにて統計上有意な減少を示した（ $p<0.05$ ）。無血清（表1）媒体に保存した角膜は、MEM2%FBSで保存した角

膜の2573±753細胞/mm²と対比し、2716±712細胞/mm²の内皮細胞数を有した。内皮細胞数に関し、これら2つの群の間には統計上の差が存在しなかった。全内皮細胞モノレイヤーは、無血清（表1）媒体およびMEM2%FBS保存群の両者につき通常の内皮細胞形態で無傷であった。角膜上皮も両群につき無傷であった。28日間の培養期間における角膜厚さは、無血清（表1）媒体およびMEM2%につきそれぞれ0.343±0.015mmおよび0.379±0.015mmであった。無血清（表1）媒体で保存した角膜は、2%FBSで保存した角膜よりも角膜厚さにて統計上有意な減少を示した（ $p<0.05$ ）。無血清（表1）媒体で保存した角膜は、MEM2%FBSで保存した角膜の2422±570細胞/mm²と対比し、2451±617細胞/mm²の内皮細胞数を有した。内皮細胞数に関し、これら2つの群の間には統計上の差が存在しなかった。全内皮細胞モノレイヤーは、無血清（表1）媒体およびMEM2%FBS保存群の両者につき通常の内皮細胞形態で無傷であった。角膜上皮も両群につき無傷であった。

【0016】この比較試験の結果から導かれる結論として、無血清（表1）媒体に14日間および28日間の両者にわたり保存した角膜は、MEM2%FBSで保存した角膜と機能上等しい生存角膜内皮を維持することができた。この無血清（表1）媒体は、通常の内皮細胞機能および代謝を維持するのに有効であった。従って、この無血清（表1）媒体は、器官培養保存媒体として使用するため許容される。

【0017】本発明は、その範囲を逸脱することなく種々の改変を行うことができる。

表1

成分	g/l
塩化カルシウム 2 H ₂ O	0.106000
無水塩化カルシウム	0.105511
硫酸マグネシウム（無水）	0.091526
塩化カリウム	0.371023
酢酸ナトリウム（無水）	0.012000
塩化ナトリウム	6.069984
磷酸ナトリウム一塩基性（無水）	0.122658
硝酸第二鉄	0.000301
L-アラニン	0.017932
L-アルギニン HCl	0.078936
L-アスパラギン H ₂ O	0.012676
L-アスパラギン酸	0.011944
L-シスチン 2 HCl	0.021979
L-グルタミン酸	0.012124
L-グルタミン	0.054292
グリシン	0.009904
L-ヒスチジン HCl · H ₂ O	0.032817
ヒドロキシー-L-プロリン	0.007629

31	32
L-イソロイシン	0.034649
L-ロイシン	0.035609
L-リジンHCl	0.053620
L-メチオニン	0.009689
L-オルニチンHCl	0.003764
L-フェニルアラニン	0.023494
L-プロリン	0.009352
L-セリン	0.010600
L-スレオニン	0.032895
L-トリプトファン	0.012276
L-チロシン2Na・2H ₂ O	0.036860
L-パリン	0.034268
アデニン硫酸塩	0.005993
アデノシン	0.003007
L-アスコルビン酸Na	0.020030
D-ビオチン	0.000016
カルシフェロール	0.000158
塩化コリン	0.001028
葉酸	0.000538
i-イノシトール	0.001055
イノシン	0.005993
ミオイノシトール	0.000050
メナジオン (重亜硫酸ナトリウム)	0.000016
ナイアシン	0.000015
ナイアシンアミド	0.000553
ニコチン酸	0.000025
P-アミノ安息香酸	0.000080
D-パントテン酸Ca	0.000528
D-パントテン酸 (半カルシウム)	0.000010
ピリドキサルHCl	0.000553
ピリドキシンHCl	0.000175
酢酸レチノール	0.000100
リボフラビン	0.000063
チアミンHCl	0.000538
DL-α-トコフェロールホスフェート2Na	0.000016
ビタミンB-12	0.004818
L-アミノ-n-酪酸	0.002204
補カルボキシラーゼ	0.000400
補酵素A Na	0.001000
2'-デオキシアデノシン	0.004000
2'-デオキシシチジンHCl	0.004000
2'-デオキシグアノシン	0.004000
フラビンアデニンジヌクレオチド2Na	0.000400
D-グルコサミンHCl	0.001540
D-グルコース	0.927557
グルクロン酸Na	0.000720
D-グルクロノラクトン	0.000720
グルタチオンNa	0.008000
5'-メチルシトシンHCl	0.000040
B-ニコチン酸アシドアデニンジヌクレオチド	0.002800

B-ニコチン酸アシドアデニンジヌクレオチドリ	酸ナトリウム
	0.000400
フェノールレッドNa	0.013276
タウリン	0.001672
チミジン	0.004000
ツイーン80	0.005000
ウリジン5'-トリホスフェートNa	0.000400
HEPES	3.143182
コレステロール	0.000120
重炭酸ナトリウム	2.320000
ビルビン酸ナトリウム	0.066000
ゲンタマイシン	0.090000
ストレプトマイシン	0.120000
2-メルカプトエタノール	0.3mM
硫酸コンドロイチン	3.000000
L-アスコルビン酸	0.010566
L-アリニル-L-グルタミン	2mM
グルタチオンNa還元	0.307000
(+)- α -トコフェロール酢酸塩	0.441120
組換えヒトインシュリン	0.006000
組換えヒトPDGF-BB	0.000200
B-エストラジオール	0.000001
プロゲステロン	0.000002
D-カルニチンHCl	0.002500
ピリドキサール-5-ホスフェート	0.001000
ベタインHCl	0.001250
L- α -ホスファチジルコリン	0.000500
ヒポキサンチン	0.000180
2-デオキシ-D-リボース	0.000300
D-リボース	0.000300
キサンチン	0.000206
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.60E-06
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.63E-04
セレンナイトNa	1.73E-05
クエン酸第二鉄	1.16E-03
MnSO ₄ · H ₂ O	1.70E-08
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	1.40E-05
モリブデン酸、アンモニウム	1.24E-07
NH ₄ VO ₃	6.50E-08
NiSO ₄ · 6H ₂ O	1.30E-08
SnCl ₂ (無水)	1.20E-08
AlCl ₃ · 6H ₂ O	1.20E-07
AgNO ₃	1.70E-08
Ba (C ₂ H ₃ O ₂) ₂	2.55E-07
KBr	1.20E-08
CdCl ₂	2.28E-07
CoCl ₂	2.38E-07
CrCl ₃ (無水)	3.20E-08
NaF	4.20E-07
GeO ₂	5.30E-08

35

K I

R b C l

 $Z r O C l_2 \cdot 8 H_2 O$

36

 $1.70E-08$ $1.21E-07$ $3.22E-07$

【図面の簡単な説明】

体の効果を示す図である。

【図1】 ヒト角膜内皮細胞に対する血清および無血清媒

【図1】

FIG. 1

ヒト角膜内皮細胞に対する血清および
無血清培地の効果